UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

212

O. VERONA

Influenza di liquidi colturali fungini sullo sviluppo dei microbi del suolo

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME VII - (XLV DALLA FONDAZIONE)
— 1946 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
24 AUG. 1948

UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

212

O. VERONA

Influenza di liquidi colturali fungini sullo sviluppo dei microbi del suolo

Estratto dagli ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA
NUOVA SERIE - VOLUME VII - (XLV DALLA FONDAZIONE)
— 1946 —

ARTI GRAFICHE TORNAR - PISA

RIASSUNTO - L'A. ha osservato che filtrati colturali di alcuni Eumiceti isolati dal terreno si manifestano sulla microflora terricola inattivi oppure ad azione antibiotica o stimolante.

È stata particolarmente studiata tale azione antibiotica e discussa nei riguardi dell'influenza che eventualmente può esercitare sulla carica microbica del suolo. Infine, è stato osservato che gli stessi filtrati colturali fungini provocano fenomeni di dissociazione.

Da tempo è stata studiata l'influenza dei liquidi colturali fungini sulla germinazione dei semi e sullo sviluppo delle piante superiori. Sperimentati funghi fitopatogeni e funghi normalmente presenti nel terreno, è emerso come i prodotti del loro metabolismo contenuti nei liquidi colturali si dimostrano ora inattivi, ora — più raramente — stimolanti, ora, invece, inibenti lo sviluppo o d'insieme o semplicemente radicale o fogliare. Fu notato che questi composti inibenti sono verosimilmente costituiti da basi azotate fisse; che sono in gran parte termoresistenti; che, finalmente, vengono più o meno trattenuti (adsorbiti) dal complesso colloidale del terreno (1).

Era verosimile di pensare che tali liquidi colturali manifestassero analogo comportamento sulla popolazione microbica del suolo nel senso di aversi azioni di stimolo o azioni di antibiosi; esperienze, però, condotte sotto questo punto di vista, non risulta siano state eseguite.

Ora, la ricerca può rivestire, un qualche interesse data la presenza nel terreno di Eumiceti, presenza che talvolta sale a cifre comparativamente e com-

(1) - VERONA O. - *Appunti di Pedopatologia: in particolare l'intossicamento microbiologico del suolo* - Atti R. Acc. dei Fisiocritici, Sez. Agraria, vol. VI, 1939.

plessivamente notevoli; inoltre, una indagine in tal senso, può essere messa in rapporto ai più recenti studi relativi alle sostanze antibiotiche e a quelli, anche recenti, intesi a chiarire i rapporti che vengono ad assumere tra loro (direttamente o indirettamente attraverso composti da loro elaborati) le varie specie microbiche prosperanti nel suolo.

A quest'ultimo riguardo già WAKSMAN e WOODRUFF, nel 1940 (1), avevano notato una forte azione inibente dei filtrati colturali di *Pseudomonas aeruginosa* sia sulla comune microflora del terreno che su *Bact. coli* artificialmente aggiunto al suolo stesso; e del pari azione inibente ebbero a notare da parte di una sostanza estratta da Attinomiceti e allora denominata *actinomicina*.

Successivamente WAKSMAN e SCHATZ (2) vollero seguire le modificazioni che eventualmente subiva la microflora terricola aggiungendo al suolo non i liquidi colturali, ma addirittura colture attive. Essi scelsero per i loro esperimenti *Sarcina lutea* e *Bact. coli*. Proseguito l'esperimento per 40 giorni notarono, a mezzo di conte periodiche, che la presenza sia di *Sarc. lutea* che di *Bact. coli* stimolava in modo rilevante il generale sviluppo microbico solo eccettuati gli Attinomiceti e i funghi. Fatto singolare, *Sarc. lutea* e *Bact. coli* diminuivano di numero, nonostante periodiche aggiunte suppletive, con il passare del tempo: tanto, che *Sarc. lutea*, ad es., si presentava al 40^0 g. scarsamente reperibile. In altri termini, la presenza delle due specie, aveva dimostrato stimolare lo sviluppo microbico; ma la stessa presenza aveva anche determinato un aumento, più o meno sensibile con il tempo, di microbi antagonisti alle due specie.

Ebbene, queste esperienze, per non ricordarne altre, dimostrano l'interesse che siffatti o similari studi assumono ai fini di una più esatta definizione delle conoscenze riguardanti i mutui reciproci rapporti che le microforme viventi nel terreno assumono tra loro.

* * *

L'oggetto delle ricerche delle quali qui si riferisce era quello di vedere

(1) - WAKSMAN S. A. e WOODRUFF H. B. - *Survival of Bacteria added to soil and the resultant modification of soil population* - Soil Science, **50**, *421*, 1940.

(2) - WAKSMAN S. A. e SCHATZ A. - *Soil enrichment and development of antagonistic microorganisms* - Journ. of Bact., **51**, *305*, 1946.

l'influenza esercitata dai liquidi colturali fungini (limitatamente ad alcune specie isolate dal suolo) sui microbi terricoli. I funghi con i quali è stato sperimentato furono una specie di Aspergillo (*Aspergillus* sp.), *Chaetomium globosum, Chaetotomium* sp., *Stachybotris atra, Stemphylium botryosum, Alternaria tenuis,* un Fusario (*Fusarium* sp.), *Rhizopus nigricans* e *Mucor mucedo.*

1ª ESPERIENZA - Le specie elencate furono coltivate in un mezzo costituito da acqua di fonte più infuso di grano 25 % (1), peptone Witte 1,5 % e saccarosio 2 %. Le colture, che svilupparono rigogliosamente, furono dopo 15 giorni a 24° C. filtrate e il filtrato aggiunto, in varie proporzioni, all'agar-fagiuoli saccarosato quasi sempre impiegato in questo Istituto nella conta dei microbi del suolo. Con l'agar variamente addizionato dei filtrati colturali fungini furono quindi allestite capsule Petri previamente seminate con cc. 0,1 di uno stemperamento di terra in acqua nel rapporto di 1 : 1000. Procedendosi alla conta dopo 3 giorni di coltura a 24° C. risultò quanto figura nell'annessa Tab. 1.

TAB. 1 - Numero di colonie in piastre seminate con cc. 0,1 di terra 1 : acqua 1000 e allestite con agar-fagiuoli addizionato o no di liquidi colturali fungini dopo 3 gg. a 24° C.

(medie di tre determinazioni)

Liquido colturale proveniente da colture di:	% di liquido colturale fungino			
	—	1	2,5	5
Aspergillus sp.	496	28	16	4
Chaetomium sp.	»	9	4	—
— *globosum*	»	190	75	24
Stachybotris atra	»	340	760	525
Stemphylium botryosum	»	345	470	350
Alternaria tenuis	»	574	360	432
Fusarium sp.	»	710	430	520
Rhizopus nigricans	»	387	410	461
Mucor mucedo	»	315	405	381

(1) - L'infuso di grano fu ottenuto facendo bollire, per qualche tempo, gr. 250 di grano in 1000 di acqua.

L'esperienza dimostra che, a seconda delle specie da cui provengono, i liquidi colturali fungini possono contenere sostanze più o meno fortemente ostacolanti lo sviluppo microbico. Particolarmente attivi si sono dimostrati, nell'esperienza, i liquidi provenienti dall'*Aspergillus* sp. e dalle due specie di *Chaetomium;* in molto minor misura quello proveniente da *Stach. atra.* Per quanto si riferisce ai primi il fatto non ha molto sorpreso giacchè l'azione antibiotica dell' Aspergillo già fu notata nelle piastre di isolamento e i *Chaetomium* già sappiamo sono date come specie producenti sostanze antibiotiche.

Di contro, si hanno specie che sembra elaborino sostanze stimolanti come si è manifestato nel caso di *Fusarium* sp.

2ª ESPERIENZA - A conferma di quanto osservato fu allestita una seconda esperienza variando la tecnica di coltura dei funghi. Essi furono, cioè, coltivati per 10 giorni a 24° C. in matracci contenenti crusca addizionata, per ogni 100 gr., di cc. 150 di soluzione di Czapek-Dox priva di glucosio. Al termine del decimo giorno i composti provenienti dal metabolismo fungino furono estratti versando nei matracci, in ragione di cc. 200 per ogni 100 gr. di crusca, una soluzione tampone a pH 7.38 costituita da 2 parti di una soluzione M/15 di fosfato bisodico e 8 p. di una sol. M/15 di fosfato monopotassico. Dopo agitazione i liquidi furono filtrati, come al solito, e quindi fu proceduto come in precedenza (v. Tab. 2).

Questa seconda esperienza conferma quindi i risultati della prima. Indica inoltre che non esistono differenze sensibili tra le due tecniche colturali seguite. È verosimile però, a questo riguardo, che cambiando substrato si verifichino delle variazioni nel potere antibiotico (come avviene, ad es., nella coltura di *Pen. notatum)* o stimolante dei funghi sperimentati. Ma questo non rientrava nell'oggetto delle presenti ricerche.

3ª ESPERIENZA - Ad ulteriore conferma di quanto sopra si è eseguita l'esperienza seguente. In matracci da cc. 1000 si è versato cc. 250 di brodo nutritivo. Previa sterilizzazione, mentre taluni recipienti furono tenuti di controllo in altri si aggiunsero cc. 5 % di liquido colturale fungino (ovviamente filtrato) proveniente da colture di *Aspergillus* sp. e *Chaetomium* sp. Tutti furono seminati con cc. 0,5 di uno stemperamento di terra in acqua nel rapporto

TAB. 2 - Numero di colonie in piastre seminate con cc. 0,1 di terra 1 : acqua 1000 e allestite su agar-fagiuoli addizionato o no di liquidi colturali fungini ottenuti in modo diverso dalla precedente esperienza, dopo 3 gg. a 24° C.
(medie di tre determinazioni)

Liquido colturale proveniente da colture di:	% di liquido colturale fungino			
	—	1	2,5	5
Aspergillus sp.	542	35	26	3
Chaetomium sp.	»	12	2	—
— *globosum*	»	320	115	50
Stachybotris atra	»	451	512	478
Stemphylium botryosum	»	527	630	650
Alternaria tenuis	»	586	415	566
Fusarium sp.	»	720	818	641
Rhizopus nigricans	»	655	562	450
Mucor mucedo	»	621	537	414

di 1 a 1000. Coltivati a 24° C. fu periodicamente determinato nei vari liquidi la carica microbica con il metodo delle colture in piastra usando, come terreno di coltura, agar-fagiuoli. Risultò:

TAB. 3 - Numero di microbi in cc. 1 di liquido colturale, contenente o no liquidi colturali fungini, sviluppantisi in piastre all'agar-fagiuoli. Conta eseguita dopo 5 gg. di coltura a 24° C.
(medie di tre determinazioni)

Dopo giorni:	N.° di microbi per cc.		
	controllo	presente filtrato da *Aspergillus* sp. 5 %	presente filtrato da *Chaetomium* sp. 5 %
1	270.000	12.000	65.000
2	3.724.000	46.330	87.120
3	7,410.000	93.400	70.300
4	»	87.515	124.110
5	»	182.620	398.500
6	»	490.475	718.300

I risultati di cui alle precedenti esperienze rimangono confermati; i liquidi colturali di *Aspergillus* sp. e *Chaetomium* sp. manifestano evidente azione antibiotica.

4ª ESPERIENZA - A complemento di queste esperienze si è voluto ricercare: 1) se i composti presenti nei filtrati colturali sono termostabili; 2) se possono essere trattenuti dal terreno.

Per questo, operando come nella prima esperienza, si è fatto uso dei liquidi provenienti da colture di *Aspergillus* sp. e *Chaetomium* sp. dopo averli sottoposti in un caso ad ebullizione per 10 minuti, nell'altro caso a forte sbattimento con terra decisamente argillosa.

I risultati figurano nella annessa Tab. 4:

TAB. 4 - Numero di colonie in piastre seminate con cc. 0,1 di terra 1 : acqua 1000 e allestite con agar-fagiuoli addizionato o no di liquidi colturali fungini dopo 3 gg. a 24° C.

(medie di tre determinazioni)

Liquido colturale proveniente da colture di:	% di liquido colturale fungino		
	—	25	5
Aspergillus sp.			
— dopo ebullizione per 10'	740	110	97
— dopo sbattimento con terra	»	520	643
Chaetomium sp.			
— dopo ebullizione per 10'	740	270	29
— dopo sbattimento con terra	»	881	540

I liquidi, cioè, si dimostrano nel loro potere antibiotico termostabili; per contro le sostanze che manifestano azione antibiotica appaiono trattenute in forte misura dal terreno.

* * *

Il potere antibiotico rilevato in alcuni filtrati colturali di Eumiceti non costituisce, da un punto di vista generale, un reperto nuovo. Dal particolare

punto di vista per cui è stato indagato può avere, invece, un qualche significato giacchè potrebbe spiegare in alcuni casi l'insufficienza numerica degli Schizomiceti in quei terreni ove si riscontri un numero elevato di funghi. Le azioni antibiotiche riscontrate in vitro si può pensare che si ripetano anche in Natura. Ma quale valore esse possono assumere? In più precisi termini, i prodotti elaborati dal metabolismo della flora eumicetica possono in ogni caso costituire fattore limitante allo sviluppo degli Schizomiceti?

Qualora si rifletta che tali composti vengono elaborati non certo in considerevoli quantità e quando si pensi che essi vanno incontro, nell'ambiente, a forti diluizioni, c'è fortemente da dubitare che nel terreno essi esercitino forte azione inibente rispetto agli Schizomiceti. Si aggiunga che il terreno si dimostra capace di trattenerli, più o meno, e che, finalmente, essi possono inattivarsi per la contemporanea presenza di agenti chimici diversi che evidentemente bloccano i raggruppamenti attivi.

Quest'ultima considerazione è tratta da quanto verificasi per gli antibiotici di uso terapeutico, come ad es. la streptomicina, che risulta inattivata da glucosio e altri zuccheri, da composti chetonici e solfidrilici oltre che da alcuni gas come azoto ed anidride carbonica (1).

A riprova di ciò si è allestita una semplice esperienza. Si è preso Kg. 1 di buona terra di giardino, si è fatta essicare all'aria e si è setacciata. Quindi, prelevatone in quantità di 400 gr., si è distribuita in parti uguali in due recipienti di vetro. In ciascuno furono versati cc. 100 di acqua e, dopo tre giorni, mentre in uno fu versata altra acqua in misura di cc. 50, nell'altro furono versati cc. 50 di filtrato colturale proveniente da colture di *Chaetomium* sp. Trascorse 24 ore fu iniziato il conteggio dei microbi nell'uno e nell'altro terreno con il sistema delle piante allestite con agar-fagiuoli e contate dopo 7 giorni a 24° C. Nessuna palese differenza si è registrata nei due terreni, trascorso anche del tempo, come figura nella Tab. 5.

(1) - GEIGER W. B., GREEN S. R., WAKSMAN S. A. - *The inactivation of Streptomycin and its Pratical Applications* - Proc. of the Soc. for Experim. Biology and Medicine, vol. 61, p. 187, 1946; ed inoltre: DENKEWALTER R., COOK M., TISHLER M., Science, vol. 101, p. 12, 1945.

TAB. 5 - Numero di microbi per gr. 1 di terra secca in terreno trattato e non trattato con filtrato fungino di *Chaetomium* sp. sviluppatisi su piastre all'agar-fagiuoli dopo 7 gg. a 24° C.

(medie di tre determinazioni)

Dopo giorni:	terreno non trattato (controllo)			terreno trattato		
	Batteri	Attino-miceti	Funghi	Batteri	Attino-miceti	Funghi
all' inizio	4.560.000	20.000	140.000	4.560.000	20.000	140.000
1	3.870.000	7.000	80.000	4.260.000	9.000	108.000
2	5.220.000	12.000	98.000	6.040.000	19.000	151.000
4	4.160.000	15.000	127.000	5.110.000	23.000	130.000
8	3.650.000	9.000	94.000	4.220.000	14.000	122.000
15	6.020.000	8.000	115.000	5.150.000	9.000	97.000

* * *

Nel corso delle presenti ricerche è emerso tuttavia un fatto che, forse, non è stato ancora segnalato.

Procedendo al conteggio delle colonie venne fatto di sospettare, durante l'esame delle piastre preparate con agar più filtrato fungino, che lo stesso filtrato avesse determinato, oltre che azione antibiotica, anche fatti dissociativi in seno alle singole specie che si erano spiluppate. Tale sospetto indusse ad eseguire in un numero considerevole di colonie il saggio della agglutinazione alla tripaflavina. In molti casi il reperto fu più o meno evidentemente positivo. Lo stesso non si verificò, all' opposto, per le colonie sviluppatesi in piastre ove non erano apparse azioni limitanti.

Il fatto ci sembrò di un qualche interesse onde fu creduto opportuno di approfondirlo al fine di vedere se, i filtrati fungini, risultassero realmente stimolanti gli intravisti fatti dissociativi. Fu sperimentato solo con i liquidi provenienti da colture di *Aspergillus* sp. *e Chaetomium* sp. prendendo in esame il comportamento di due specie — *Bact. coli* e *Bact. tumefaciens* — ben note nei loro caratteri di fase.

Venne allestita, pertanto, una serie di tubi contenenti agar nutritivo addizionato di filtrati fungini in diverse proporzioni e fino alla quantità del 10 %

e su essi seminate le due colture provenienti dalla collezione dell' Istituto. Esse si presentavano, naturalmente, in fase normale.

Contrariamente a quanto ci era dato di aspettare lo sviluppo fu in ogni caso positivo sebbene un poco stentato e non abbondante nei tubi contenenti le più forti quantità di filtrato. Evidentemente queste due specie non si dimostarono molto sensibili all'azione dei filtrati usate. Il saggio alla tripaflavina fu negativo.

Dalle colture ove lo sviluppo si era manifestato più scarso fu allora eseguito un ulteriore passaggio. Sviluppo, come al solito, non abbondante; agglutinazione alla tripaflavina negativa. Insistendo nei passaggi, al quarto la reazione di agglutinazione incominciò però a manifestarsi; al quinto passaggio fu tipica. Macroscopicamenle non apparì tuttavia nessuna di quelle modificazioni che sono note come caratteristiche della fase R qualora si prescinda da un aspetto meno mucoso delle patine in *Bact. tumefaciens* e dalla presenza di rare coloniette secondarie in *Bact. coli.*

Al 7° passaggio la reazione di agglutinazione si mantenne positiva; le patine in *Bact. tumefaciens* si presentarono più secche e in *Bact. coli* più ricche di coloniette secondarie. Nei passaggi eseguiti su agar non addizionato di filtrati colturali fungini non fu notata nessuna modificazione che desse indice di fatti dissociativi. Con materiale proveniente da queste patine e opportunamente diluito in acqua sterile furono allora allestite colture a piatto usando come terreno agar-nutritivo. Eliminate le piastre troppo dense, nelle altre fu notato che in media il 65 % di colonie di *Bact. tumefaciens* e il 72 % di colonie di *Bact. coli* si presentava tipicamente in fase R.

Almeno nelle specie sperimentate i filtrati colturali fungini si sono dunque dimostrati di stimolo alla dissociazione, se pure con una qualche lentezza. Risultati analoghi, per *Bact. coli*, erano già stati ottenuti, del resto, da FRENDZEL e SZYMANOSKII [1] per non dire di altri; solo che questi avevano utilizzato come stimolante filtrati provenienti da colture del b. del tifo.

Ebbene, la possibilità che nel terreno si formino composti antibiotici e che sotto il loro stimolo (entro i limiti posti alla efficacia della loro azione) si determinino fatti dissociativi in alcune specie microbiche, riveste una certa

(1) - FRENDZEL e SZYMANOSKII - Centr. f. Bakt. *I*, v. 119, p. 334, 1931.

importanza e, insieme ad altre cause, ci può dare ragione dell' insorgenza degli stessi fatti dissociativi.

Nel suolo, le varie specie microbiche, vanno bene spesso soggette, infatti, a variazioni più o meno profonde. Noi stessi, in ricerche da poco ultimate, abbiamo messo in evidenza questo fatto nei riguardi di *Azotobacter chroococcum* (1) ed è recente un lavoro di PREVITERA (2) in cui si dimostra che *Bact. coli*, nel terreno, può trasformarsi al punto da presentarsi con quei caratteri che ci sono noti per *Bact. aerogenes.*

* * *

Concludendo, per quanto nella presente Nota è stato esposto, risulta che:

1) alcuni filtrati colturali di Eumiceti isolati dal terreno si manifestano sulla flora terricola ora inattivi, ora invece ad azione antibiotica o ad azione stimolante;

2) particolarmente studiata con i liquidi grezzi l'azione antibiotica si è visto che essa permane anche se i liquidi vengono sottoposti a prolungato riscaldamento;

3) tale azione antibiotica si perde nei liquidi fortemente e a lungo sbattuti con terra; verosimilmente i composti attivi vengono trattenuti dal complesso colloidale del terreno;

4) si avanza l' idea, in base a qualche esperienza, che l'azione antibiotica riscontrata in vitro non sia tale in Natura da incidere considerevolmente (o solo in limitati casi) sulla microflora terricola; e questo in quanto le quantità di antibiotici che si producono possono non essere considerevoli mentre subiscono nell'ambiente attenuazioni e diluizioni notevoli; le attenuazioni possono essere rappresentate dallo stesso ambiente atto a trattenere le sostanze attive oppure dalla concomitante presenza di particolari agenti chimici; d'altra parte alle azioni antibiotiche si contrappongono azioni di stimolo;

5) i filtrati colturali fungini che hanno manifestato azione antibiotica si sono altresì dimostrati fattori stimolanti la dissociazione microbica.

(1) - VERONA O. - *Sullo stato di fase di "Azotobacter choococcum„ Beij* (in corso di stampa).

(2) - PREVITERA A. - *Sulla variazione dell'Escherichia coli nel terreno* - Atti Acc. Fisiocritici - Siena - ser. V, vol. XIII, p. 118, 1945.